



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: NANOPARTÍCULAS ESTÍMULO-
RESPUESTA PARA LA LIBERACIÓN DE
FÁRMACOS**

Autor: Nuria Lafuente Gómez

Tutor: M. Victoria Cabañas Criado

Convocatoria: Junio 2017

Resumen

La necesidad de aumentar la eficacia terapéutica y de reducir los efectos adversos de fármacos usados en patologías de difícil tratamiento ha llevado a un gran desarrollo de la nanotecnología. Existe una gran variedad de nanopartículas diseñadas para transportar y liberar fármacos en respuesta a un estímulo. Este puede ser interno (pH, concentración de enzimas o de metabolitos y gradiente redox) o externo (temperatura, campo magnético, ultrasonidos y luz). Así, se trata de controlar la liberación del principio activo en el espacio y/o tiempo.

Los objetivos de este trabajo son describir estos nanotransportadores, analizar las situaciones patológicas en las que podrían usarse y valorar sus potenciales aplicaciones en la clínica. Profundizando en los avances conseguidos en la última década, se aporta una visión global de las posibilidades que ofrecen las nanopartículas estímulo-respuesta en la liberación de fármacos y cómo los avances en la ciencia de materiales, el desarrollo farmacéutico y la investigación fisiopatológica de las enfermedades son fundamentales para el perfeccionamiento y la llegada al uso clínico de estos nanosistemas.

Palabras clave: nanotecnología, nanopartículas estímulo-respuesta, sistemas de liberación de fármacos, materiales inteligentes.

Introducción y antecedentes

La nanotecnología ha tenido un gran impacto en muchos ámbitos de la ciencia y son especialmente relevantes sus aplicaciones médicas. Las nanopartículas (NPs) engloban muchos tipos de nanoestructuras que han demostrado tener un gran potencial para transportar fármacos usados en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades¹.

La primera vez que se utilizó el término de *nanopartícula* para la liberación de fármacos fue en 1976 para describir unas partículas poliméricas de 100 nm que transportaban viriones². *The Royal Society and Royal Academy of Engineering* propuso en 2004 una definición de nanopartícula según la cual su tamaño oscila entre 1 y 100 nm. Sin embargo, no todas las NPs usadas con fines médicos cumplen esta definición³. En realidad, no hay una razón específica por la que establecer el límite superior en 100 nm. El principio fundamental que diferencia a las NPs del resto no es el tamaño, sino que tienen nuevas características que no presentan los mismos materiales en mayores dimensiones como, por ejemplo, que su superficie en proporción a su masa es mucho mayor que en otras partículas⁴. Por eso, en nanomedicina los sistemas considerados NPs para la liberación de fármacos oscilan entre 10 y 1000 nm.

Si el tamaño es inferior a 10 nm, se excretan por orina sin llegar a la diana terapéutica y si el tamaño es superior a 1 μm se la considera micropartícula^{3,4}.

Las NPs se clasifican, atendiendo a su composición, en NPs orgánicas (poliméricas, dendrímeros, liposomas y micelas) y en NPs inorgánicas (de oro, de óxidos de hierro, de sílice mesoporosa y nanotubos de carbono), como se recoge en la *figura 1*. También hay nanotransportadores que combinan los dos tipos de componentes, son las NPs híbridas. Los fármacos pueden incorporarse por encapsulación (en cuyo caso quedan recluidos en el interior del sistema), por adsorción a su superficie, por absorción y por conjugación (de este modo el principio activo queda unido covalentemente al nanotransportador). Esto depende del método de síntesis utilizado^{1,5}.

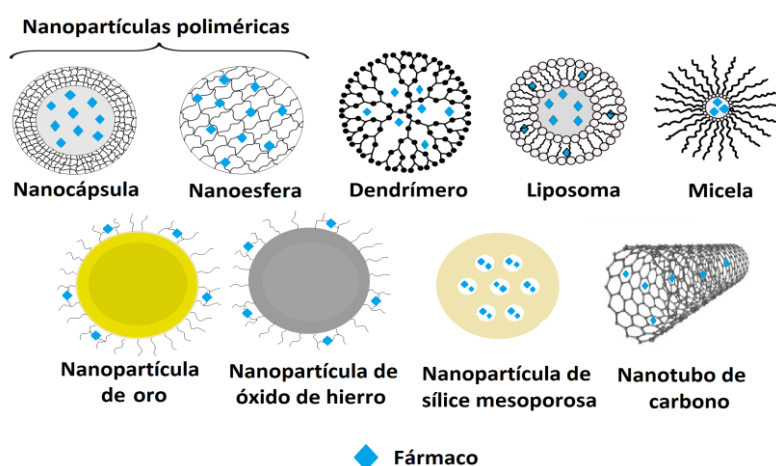


Figura 1.- Representación de los tipos de nanopartículas utilizados como sistemas de liberación.

Para el uso clínico de estos sistemas, los materiales que constituyen el nanotransportador deben ser biocompatibles, estables en condiciones fisiológicas, con gran capacidad de carga de fármacos y baja toxicidad. Al encapsular los fármacos en estos sistemas se les protege del rápido metabolismo y excreción^{3,6}.

Para evitar los efectos secundarios sistémicos, debidos a la biodistribución inespecífica y a la liberación incontrolada de los fármacos de los sistemas de liberación convencionales, se han desarrollado los sistemas de liberación de fármacos estímulo-respuesta o inteligentes. Estos transportadores liberan el fármaco tras producirse un estímulo que puede ser interno o externo⁶. Los materiales que los constituyen deben experimentar una protonación específica, una escisión hidrolítica, cambios moleculares o supramoleculares en respuesta al estímulo o ser susceptibles a una estimulación física concreta⁷.

La primera vez que se usó el concepto de liberación de fármacos estímulo-respuesta fue en 1978. Se desarrollaron unos liposomas cargados con el antibiótico neomicina que lo liberaban al aumentar la temperatura (44°C) mientras que lo retenían a temperatura fisiológica (37°C)⁸.

Respecto a los estímulos, se clasifican en internos (o endógenos) y externos (o exógenos). Dentro de los estímulos internos se encuentran los cambios en el pH, variaciones en la concentración de enzimas o metabolitos y gradientes redox. En este caso, se aprovechan los cambios tisulares asociados a situaciones patológicas como el cáncer, diabetes, isquemia, enfermedades inflamatorias o infecciones para desencadenar la liberación del fármaco. Como estímulos externos se pueden usar cambios de temperatura, un campo magnético, ultrasonidos y luz⁷. El objetivo es que tras la administración sistémica de las NPs se pueda desencadenar la liberación del fármaco con uno de esos estímulos⁹ (Figura 2). Así se consigue reducir la toxicidad y los efectos adversos debidos a la distribución inespecífica del principio activo y se aumenta la eficacia terapéutica⁶.

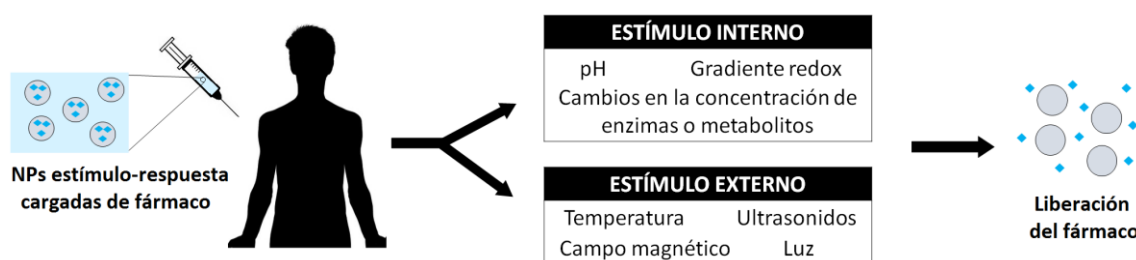


Figura 2.- Esquema de la administración y liberación del fármaco de las NPs

Objetivos

Debido a los grandes avances de la nanotecnología en el desarrollo de nuevos sistemas inteligentes para la liberación de fármacos, este trabajo tiene como objetivos:

- Describir los nanosistemas diseñados para liberar fármacos en respuesta a los estímulos internos y externos y los principios fisicoquímicos que rigen su comportamiento.
- Analizar las situaciones patológicas que pueden beneficiarse de estos nanosistemas.
- Valorar las potenciales aplicaciones de las NPs estímulo-respuesta en la práctica clínica.

Material y métodos

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de artículos científicos publicados en revistas de alta calidad que están recogidos en bases de datos como PubMed, Google académico y ScienceDirect. Las palabras clave usadas para realizar la búsqueda han sido: *nanotechnology*, *nanomedicine*, *stimuli-responsive nanoparticles*, *smart nanoparticles* y *drug delivery systems*.

Los artículos consultados han sido publicados en la última década (a excepción de los referidos a los antecedentes). El propósito es mostrar una visión actualizada de los avances conseguidos en los últimos años.

Resultados y discusión

El gran progreso en la ciencia de materiales y el desarrollo farmacéutico han permitido diseñar nuevas clases de sistemas de liberación de fármacos. En lo referido a la nanotecnología, se estima que abarcará aproximadamente la mitad de la producción de medicamentos mundial en 2020¹⁰.

Las NPs estímulo-respuesta constituyen un campo importante de investigación. Con ellas se pretende controlar la liberación del fármaco y, con ello, aumentar la concentración del mismo en el lugar de acción y su biodisponibilidad¹¹. Los avances en estos nanosistemas permiten reformular los medicamentos ya existentes para aumentar la eficacia (porque se protege al fármaco del metabolismo) y la seguridad (por reducir los efectos secundarios por la liberación selectiva)¹². Algunas características relevantes de las NPs se recogen en la *tabla 1*.

Tabla 1.-Tipos de nanopartículas y algunas de sus características

Nanopartícula polimérica	Nanocápsula: núcleo líquido (acuoso u oleoso) que contiene el fármaco rodeado de una membrana polimérica ¹ .
	Nanoesfera: matriz polimérica donde el polímero y el fármaco están uniformemente repartidos ¹ .
Dendrímero	Polímeros sintéticos ramificados forman una estructura tipo árbol. El fármaco puede encapsularse en las cavidades internas o incorporarse en la superficie externa por enlaces covalentes o interacciones electrostáticas ¹² .
Liposoma	Bicapa lipídica autoensamblada que encierra un núcleo acuoso. Pueden incorporar fármacos hidrosolubles en el núcleo y fármacos liposolubles en la bicapa lipídica ⁶ .
Micela	Núcleo hidrofóbico que permite incorporar fármacos liposolubles rodeado de una corteza de polímeros hidrofílicos que lo estabilizan ¹² .
Nanopartícula de oro	Partícula de oro con propiedades plasmónicas que al ser funcionalizado con distintas moléculas (proteínas, polímeros) puede unir el fármaco ⁶ .
Nanopartícula de óxido de hierro	Núcleo de óxido de hierro superparamagnético que actúa como un dominio magnético. Puede funcionalizarse para incorporar el fármaco ¹² .
Nanopartícula de sílice mesoporosa	Estructura esférica con poros donde se pueden incorporar fármacos y que pueden taparse con sustancias que respondan a un estímulo. Su apertura determina la liberación de los principios activos ⁶ .
Nanotubo de carbono	Estructura tubular que funcionalizada es soluble y biocompatible. Los fármacos se conjugan con las moléculas usadas en la funcionalización ¹³ .

Para que la liberación del fármaco sea efectiva, los nanotransportadores tienen que tener unas características que les permitan estar en la circulación sanguínea el tiempo necesario para alcanzar la diana terapéutica antes de ser eliminados y poder internalizarse en las células¹². Se ha demostrado que el tamaño, la forma y la carga son los factores clave¹⁴.

- Tamaño: las NPs miden de 10 a 1000 nm. No hay establecido un tamaño óptimo, pero el rango que abarcan asegura que no haya posibilidad de formación de trombos y que

se distribuyan por circulación sanguínea sin ser fagocitados por componentes del sistema reticuloendotelial como los macrófagos¹². Tampoco hay definidas unas medidas que aseguren su internalización por lo que debe estudiarse cada caso individualmente¹⁵. Pero, gracias a su tamaño, se acumulan más en tejidos inflamados y tumorales por el efecto EPR (*enhanced permeability and retention*). Se debe a que los vasos de esos tejidos son más permeables y a que el drenaje linfático está disminuido⁴.

- **Forma:** habitualmente son esféricas, aunque las hay con forma de disco o alargadas entre otras. Esto afecta a su internalización en las células y a la distribución sanguínea. Respecto a esta última, las que tienen forma esférica o de disco se distribuyen a más zonas durante más tiempo y las que tienen forma alargada tienen mayor capacidad de adherencia a las células¹⁵. En cuanto a la incorporación de las nanopartículas a las células, se ha demostrado que la internalización por endocitosis de las esféricas es cinco veces mayor que las que tienen forma alargada¹⁴.
- **Carga:** determina la biodistribución debido a las interacciones que puede establecer con las moléculas que circulan en la sangre¹⁴ y, fundamentalmente, afecta a su incorporación a las células¹⁵. Se espera que la internalización de las NPs positivas sea mayor que la de las negativas porque establecen interacciones electrostáticas con las cargas negativas de los grupos fosfato de las membranas celulares¹⁵.

Teniendo las NPs con las características adecuadas para poder ser aceptadas por el cuerpo y circular por la sangre hasta alcanzar el tejido diana, hay que conseguir que sean nanotransportadores inteligentes que liberen el fármaco en respuesta a un estímulo concreto. Las NPs se diseñan en función de cuál sea este estímulo¹³.

1.- Estímulos internos

En el caso de un estímulo interno, las NPs se diseñan para que sean sensibles al pH, a la concentración de enzimas o metabolitos o al gradiente redox que son característicos del tejido enfermo donde se quiere liberar el fármaco tras su administración sistémica⁶.

1.1.- pH

Se han diseñado NPs que pueden diferenciar cambios de pH sutiles en áreas enfermas específicas como tejidos inflamados, isquémicos o tumorales, e incluso en compartimentos intracelulares como los endosomas y los lisosomas⁶.

Existen dos estrategias para conseguir nanosistemas que respondan a variaciones del pH: incorporar polímeros (poliácidos o polibases) con grupos ionizables que experimenten

cambios en la conformación o en la solubilidad o que los polímeros tengan enlaces sensibles a pH ácido cuya escisión permita la liberación del fármaco anclado al mismo o la modificación de la carga del polímero⁷. Pueden producirse cambios reversibles en la conformación de las cadenas del polímero o irreversibles por la degradación del nanotransportador¹⁶.

Existen muchos nanotransportadores anticancerígenos que utilizan la ligera diferencia en el pH entre los tejidos sanos (pH= 7.4) y el medio extracelular de los tumores sólidos (pH= 6.5-7.2) para desencadenar la liberación del fármaco⁷. El medio ácido tumoral se puede explicar con el denominado efecto Warburg. Las células cancerosas producen energía principalmente por un proceso de glicolisis anaeróbica seguida de fermentación láctica en lugar de utilizar la respiración celular aeróbica. Por eso, se producen metabolitos ácidos que se acumulan en el intersticio de las células tumorales. Esto se debe a que los tumores proliferan rápidamente, el flujo sanguíneo está disminuido y hay un rápido déficit de nutrientes y oxígeno¹⁶.

Se han diseñado NPs para tratar el cáncer con polímeros con enlaces que se escinden en medio ácido como hidrazonas, β -tiopropionatos y acetales. Se han usado para unir fármacos en dendrímeros y en las compuertas de los poros de NPs de sílice mesoporosa¹¹.

Un ejemplo son las NPs de sílice mesoporosa cargadas con doxorrubicina con una compuerta en los poros formada por un dextrano modificado con un acetal. El dextrano es un polisacárido hidrosoluble y al incorporarle un grupo acetal conseguimos que pase a ser un material hidrofóbico. De modo que, mientras el sistema esté en la circulación sanguínea, la doxorrubicina estará recluida en los poros por la presencia del dextrano-acetal hidrofóbico. Cuando las NPs se internalizan en las células cancerosas, el medio ácido (pH \approx 6,5) hidroliza el acetal, la compuerta se vuelve hidrofílica y se libera la doxorrubicina¹⁷ (Figura 3).

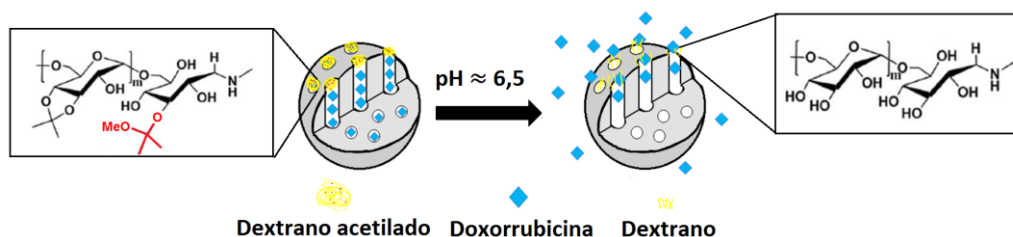


Figura 3.- NPs de sílice mesoporosa que liberan doxorrubicina para tratar el cáncer.

Por otro lado, las infecciones bacterianas también se caracterizan por valores bajos de pH debidos a la fermentación anaerobia y a la inflamación⁷. Un ejemplo de sistema de liberación inteligente para tratar las infecciones es una nanoesfera de PLGA-PLH-PEG, es decir, copolímero de poli(láctico-co-glicólico)-poli(L-histidina)-polietilenglicol, con el antibiótico vancomicina. Estos nanotransportadores no se adsorben a células de los tejidos o a componentes de la sangre porque a pH de 7,4 tienen carga negativa y la superficie pegilada

(que impide la fagocitosis por las células del sistema reticuloendotelial). La inflamación en la zona infectada aumenta la permeabilidad vascular local promoviendo la extravasación de las NPs. En el medio ácido de la infección, los grupos imidazoles de la PLH se protonan, las nanoesferas pasan a tener carga positiva, establecen interacciones electrostáticas con los elementos con carga negativa de la pared bacteriana, las bacterias las internalizan y se libera el antibiótico¹⁸.

También hay micelas y liposomas sensibles a cambios de pH. En el caso de las micelas, están constituidas por polímeros como el metoxi-polietilenglicol-poli(β -amino éster) que a pH ácido se desestabilizan y liberan el fármaco¹⁹. En el caso de los liposomas, están constituidos por derivados de la glicerol-fosfoetanolamina que pasan de una fase lamelar, donde las moléculas ambifílicas están ordenadas en capas, a una fase hexagonal fusogénica a pH ácido, donde se agregan las moléculas ambifílicas y se libera el fármaco⁷.

1.2.- Concentración de enzimas y de metabolitos

Se pueden desarrollar nanotransportadores que usen las enzimas como estímulo para liberar el fármaco. Ciertas patologías se asocian con la sobreexpresión de enzimas como las proteasas, relacionadas con la invasión tumoral y enfermedades cardiovasculares; las fosfolipasas, implicadas en muchos tipos de cáncer, trombosis e infecciones; y las oxidorreductasas, con un papel fundamental en medios oxidativos de enfermedades como la diabetes o el cáncer²⁰. También las hay exclusivas de un proceso patológico como pueden ser las infecciones bacterianas o por VIH⁷.

Por ejemplo, se han desarrollado nanopartículas micelares que responden a las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) presentes tras un infarto agudo de miocardio (IAM). Están constituidas por un esqueleto del polímero polinorborneno con secuencias peptídicas reconocidas por MMP-2 y MMP-9 dando lugar a una estructura ambifílica. Al llegar a la zona infartada, la estructura micelar se abre porque las MMPs hidrolizan los péptidos y dan lugar a una red polimérica que se une a las células infartadas y facilita su regeneración. Dentro de la micela se podrían incluir fármacos fibrinolíticos que se administran tras un IAM²¹ (Figura 5).

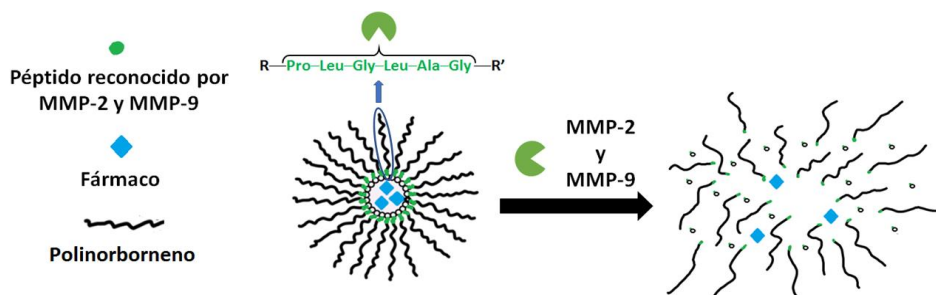
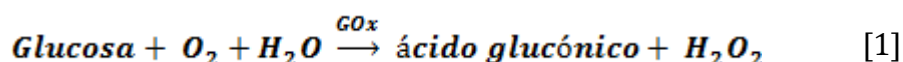


Figura 5.- Micela que libera fármacos fibrinolíticos tras un infarto agudo de miocardio.

Además, hay MMPs que se sobreexpresan en tumores por lo que se han desarrollado este tipo nanotransportadores para el tratamiento del cáncer⁷.

Dada la gran variedad de enzimas implicadas en procesos patológicos, se han diseñado NPs de sílice mesoporosa, nanoesferas, liposomas y dendrímeros que utilizan secuencias reconocidas por enzimas como estímulo para la liberación de fármacos^{7,22}.

Por otro lado, se puede utilizar la variación de la concentración de un metabolito como estímulo. Por ejemplo, la alta concentración de glucosa en sangre (hiperglucemia) que caracteriza a la diabetes. Es una enfermedad que afecta a 366 millones de personas en todo el mundo. Es el resultado de la incapacidad del cuerpo para producir suficiente insulina (diabetes tipo 1) o de las células para responder a la insulina producida (diabetes tipo 2). Por eso, el tratamiento estándar para los diabéticos tipo 1 y para los tipo 2 con la enfermedad avanzada es la administración de insulina. Para abordar esta enfermedad desde la nanomedicina, se ha desarrollado una nanored inyectable de NPs constituidas por una matriz polimérica sensible al medio ácido (de dextrano acetilado modificado, similar al utilizado en las NPs de sílice comentadas anteriormente), un recubrimiento de polímero con carga (quitosano y alginato, así obtenemos NPs con carga positiva y negativa respectivamente que se unen por fuerzas electrostáticas formando la nanored), enzimas (glucosa oxidasa, GOx, y catalasa, CAT) e insulina. En situación de hiperglucemia, la GOx cataliza la conversión de glucosa en ácido glucónico (*Reacción 1*), por lo que el pH alrededor de la nanored disminuye, y la catalasa degrada el H₂O₂ que se produce en la reacción y que desactivaría la GOx. El medio ácido produce la degradación de la matriz polimérica y se libera la insulina encapsulada²³.



Asimismo, se han desarrollado nanopartículas poliméricas, con agentes de entrecruzamiento como el ácido fenil borónico, que son sensibles a la glucosa porque tienen afinidad para unirse a ella. En una situación de hiperglucemia, la red polimérica se desestabiliza al disminuir el entrecruzamiento y se libera la insulina encapsulada²⁴.

1.3.- Potencial redox

Hay gran variedad de potenciales redox en nuestro cuerpo. El medio intracelular es más reductor que el medio extracelular y las áreas con tejido dañado o tumores son más oxidantes que los tejidos sanos²⁵.

Los enlaces disulfuro, propensos a ser escindidos por el glutathione (GSH), pueden usarse para conseguir sensibilidad redox. Estos enlaces son estables en el medio extracelular oxidante

([GSH]= 2-10 μ M) pero se reducen a grupos tioles en el medio reductor intracelular ([GSH]=2-10 mM). Además, en los tejidos tumorales la concentración de GSH es mayor⁷.

Se han desarrollado nanocápsulas cargadas con la proteína caspasa-3 (CP-3) que inducen apoptosis en células cancerígenas humanas. El núcleo está constituido por la molécula bioactiva, la CP-3, rodeada por cadenas del monómero con carga positiva N-(3-aminopropil) metacrilamida y de acrilamida entrecruzadas con N-N'-bis(acrilóil)cistamina, que será el que presente los enlaces disulfuro (S-S) (Figura 6). Las nanocápsulas, gracias a su carga positiva, son internalizadas por las células cancerígenas y, como la concentración de GSH es muy alta en el citosol, los enlaces disulfuro se reducen a grupos tioles provocando la liberación de la CP-3 situada en el núcleo de la NP. Así se induce la apoptosis de las células cancerígenas²⁶.

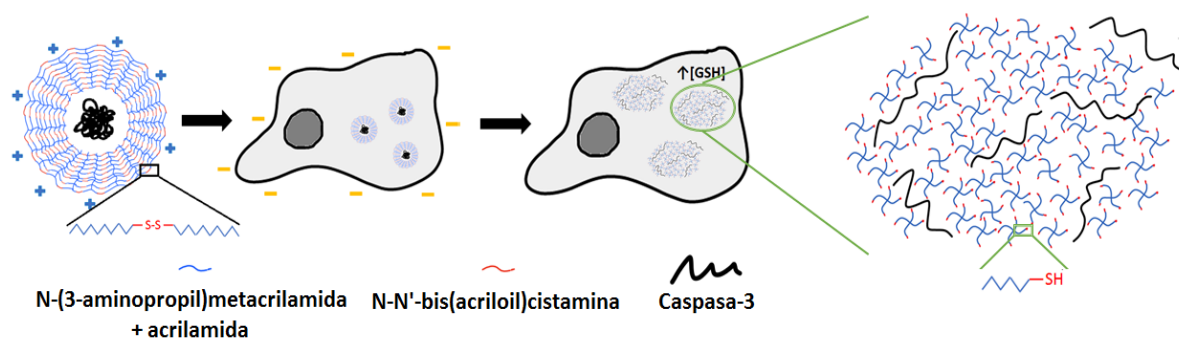


Figura 6.- Nanocápsulas que liberan caspasa-3 para el tratamiento del cáncer.

Se han utilizado los enlaces disulfuro en micelas, en liposomas, en dendrímeros y en las compuertas de nanopartículas de sílice mesoporosa⁷.

Por otro lado, la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) es importante en procesos patológicos por el estrés oxidativo. Los altos niveles de ROS son característicos de muchos tipos de cáncer, de procesos inflamatorios y de zonas isquémicas tras infartos o ictus¹¹.

Por ejemplo, se han desarrollado nanoesferas constituidas por un poliéster borónico que, en medios con ROS, como el H_2O_2 , se degradan. En medio oxidante, se induce la transformación del grupo arilo del éster borónico en un fenol rompiendo el poliéster y liberando el fármaco incorporado²⁷. También hay nanotransportadores poliméricos con grupos tiocetal con el mismo objetivo¹¹.

1.4.- Potencial clínico de las NPs sensibles a estímulos internos

A pesar de los buenos resultados obtenidos por estos nanotransportadores *in vitro* y, algunos de ellos, *in vivo* en modelos animales, ninguno ha llegado aún al uso clínico. Su eficacia está condicionada por las características de la patología en los pacientes, ya que pueden variar de unos a otros. Además, los cambios en el pH, en la concentración de una enzima y en el

potencial redox pueden ser sutiles o fluctuar durante la enfermedad. De modo que, para sacar el máximo rendimiento clínico a estos sistemas, es necesario que el desarrollo farmacéutico y de la ciencia de materiales vaya acompañado de investigación en la biología molecular y celular de las patologías. Solo así se conseguirá que estos nanosistemas inteligentes tan prometedores alcancen la clínica en un futuro cercano^{6,7,11}.

2.- Estímulos externos

Se pueden desarrollar nanosistemas que sean sensibles a estímulos exógenos como cambios de temperatura, un campo magnético, ultrasonidos y luz. Así se consigue controlar la liberación de los fármacos en la zona enferma⁶. Una ventaja de esos sistemas frente a los que responden a estímulos endógenos es que puede focalizarse la liberación del fármaco en la zona a tratar porque será donde se aplique el estímulo. Además, pueden usarse para conseguir una liberación pulsátil con sistemas on-off⁷.

2.1.- Cambios de temperatura

El uso de la temperatura como estímulo para la liberación de fármacos es una de las estrategias más estudiadas. Es especialmente relevante en el ámbito oncológico⁷.

Los nanotransportadores están diseñados para retener los fármacos a la temperatura fisiológica (37°C) y liberarlos cuando esta alcanza los 40-45°C⁶. Para aumentar la temperatura se aplica radiofrecuencia, microondas, campos magnéticos alternos o ultrasonidos. Esto se conoce como hipertemia. Los sistemas termosensibles son generalmente liposomas, micelas, nanopartículas poliméricas o dendrímeros que se pueden utilizar solos o combinados con otros tipos de NPs⁷.

La termosensibilidad de los liposomas está asociada a una transición de fase de los componentes lipídicos y los consiguientes cambios de conformación en la bicapa⁷. Un ejemplo de liposoma termosensible es Thermodox®, desarrollado por la compañía Celsion para la liberación de doxorubicina en tumores. Este nanosistema está constituido por tres componentes lipídicos: dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), monoestearatofosfatidilcolina (MSPC) y polietilenglicol-2000-diesteratofosfatidiletanolamina (PEG 2000-DSPE) en una relación molar de 90:10:4. El mecanismo por el que se libera el fármaco es que los lípidos DPPC y MSPC sufren una transición de fase de gel a líquido a una temperatura aproximada de 41°C. Cuando se alcanza esa temperatura tras aplicar radiofrecuencia, microondas o ultrasonidos, se desestabiliza la membrana y aumenta la permeabilidad de los liposomas permitiendo la liberación de la doxorubicina encapsulada²⁸, como se muestra en la *Figura 7*.

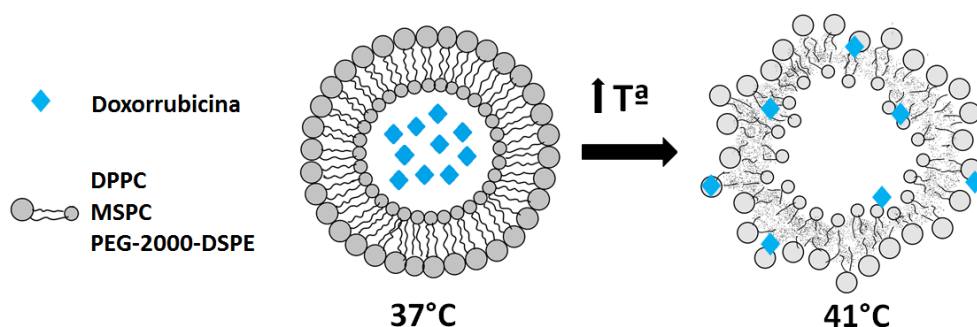


Figura 7.- Liposoma ThermoDox® que libera doxorubicina para el tratamiento del cáncer.

Este sistema tiene un gran potencial terapéutico. Se encuentra en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento del cáncer de mama, metástasis colorrectal y de hígado y de fase III para el carcinoma hepatocelular⁷.

Los polímeros termosensibles que se incluyen en las micelas, nanopartículas poliméricas y dendrímeros se caracterizan por tener una transición de fase que ocurre por encima (UCST, *upper critical solution temperature*) o por debajo (LCST, *lower critical solution temperature*) de una temperatura específica. Se dividen en dos grupos:

- Polímeros con LCST: por debajo de la LCST los polímeros son solubles y la red polimérica se hincha al formarse enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y los grupos amida del polímero. En estas condiciones se les puede cargar las moléculas de fármaco. Cuando la temperatura es superior a la LCST, los enlaces de hidrógeno y la red polimérica colapsan, el polímero se vuelve insoluble y reduce su volumen expulsando el agua y el fármaco que se había incorporado. Un ejemplo de este tipo de polímeros es el poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm).
- Polímeros con UCST: son solubles por encima de esa temperatura, se hincha el nanotransportador y se libera el fármaco. Un ejemplo es el copolímero poli(acrilamida-co-ácido acrílico) (AAm/AAC)²⁹.

2.2.- Campo magnético

La aplicación de un campo magnético sobre NPs magnéticas permite dirigir estos nanosistemas hacia la diana terapéutica cuando se aplica un campo magnético permanente, producir un aumento de temperatura cuando se aplica un campo magnético alterno o ambas situaciones cuando se usan alternativamente⁷.

El poder dirigir espacialmente las NPs magnéticas es una ventaja exclusiva de este estímulo. Así se consigue una mayor concentración de las NPs en la zona donde queremos liberar el fármaco. Un ejemplo son las nanocápsulas constituidas por un núcleo de magnetita (Fe_3O_4)

recubierto del polímero poli(anilina-co-N-1-ácido butírico anilina) que se une al fármaco carmustina (agente citotóxico). Al ser dirigido al tumor se pueden utilizar concentraciones menores de fármaco que sean eficientes y así también se reducen los efectos adversos sistémicos³⁰.

Por otra parte, al aplicar un campo magnético alterno sobre las NPs magnéticas se puede generar calor. Este proceso se conoce como magnetohipertermia (MHT). El mecanismo por el que se genera calor a partir de energía magnética se atribuye a las relajaciones de Néel y Browniana. La relajación de Néel se debe a los cambios rápidos que se producen en la dirección de los momentos magnéticos relacionados con la red cristalina (dinámica interna) y la relajación Browniana se debe a la rotación física de las partículas que actúan contra las fuerzas de la viscosidad del medio en el que se encuentran (dinámica externa). Estas dos fuentes de fricción conducen a un desfase entre el campo magnético aplicado y la dirección de los momentos magnéticos y por eso se producen las pérdidas de energía térmica³¹.

Hay dos mecanismos por los que la MHT se utiliza en los sistemas de liberación de fármacos:

- Las moléculas de fármaco están unidas por un enlace termosensible al nanotransportador que se rompe por el calor generado tras aplicar un campo magnético alterno³¹. Un ejemplo prometedor son los nanotubos de carbono con óxidos de hierro. Los nanotubos tienen anclado un polímero que lo une a las moléculas de óxido de hierro responsables de producir la hipertermia. Por otro lado, se puede incluir el fármaco a través de un enlace que se rompa y libere el principio activo con el aumento de la temperatura³².
- Una red polimérica encapsula las nanopartículas magnéticas y el fármaco. Al aplicar un campo magnético alterno se genera calor que produce grietas en la matriz por donde se libera el principio activo. Algunos polímeros que se pueden utilizar son: PNIPAAm, ácido poliláctico (PLA) y polimetilmetacrilato (PMMA)³¹. También el polímero puede utilizarse como una compuerta que cierra los poros de nanopartículas de sílice mesoporosa hasta alcanzarse las altas temperaturas y permitir la liberación del fármaco⁷.

Un ejemplo de nanosistema que utiliza la MHT es NanoTherm® de la compañía Magforce. Está formado por NPs de óxido de hierro (FeO-NPs) dispersadas en un medio acuoso. Las FeO-NPs están constituidos por un núcleo de magnetita (Fe_3O_4) rodeado de grupos aminosilanos. Se inyectan directamente en el tumor gota o gota y se aplica un campo magnético alterno en la zona que genera calor. El aumento de la temperatura es capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales y las hace más sensibles a otros tratamientos de

radioterapia y quimioterapia³³. Según datos de Magforce, NanoTherm® está en ensayos de fase I y II para el tratamiento del glioblastoma, cáncer de próstata, de esófago y pancreático. La MHT por sí sola no puede acabar por completo con las células cancerígenas. Es por eso por lo que se plantea la incorporación de fármacos antitumorales a nanosistemas que responden a un campo magnético como NanoTherm®. Así la MHT reduciría el crecimiento del tumor aumentando el espacio entre las células y esto permitiría al fármaco difundir y acabar con todas las células tumorales. De este modo, el propio campo magnético se puede utilizar como estímulo para desencadenar la liberación del fármaco reduciendo así los efectos secundarios en tejidos sanos. En este sentido, se han realizado estudios con un nanotransportador que combina un núcleo de NPs de Fe₃O₄ con el polímero ácido polipirrol-3-carboxílico que lleva incorporado doxorrubicina. Al alcanzarse los 44°C, el polímero alcanza su temperatura de transición vítrea permitiendo la liberación de la doxorrubicina³⁴.

2.3.- Ultrasonidos

El uso de ultrasonidos es atractivo por su naturaleza no invasiva, la ausencia de radiaciones ionizantes y la fácil regulación de la profundidad de penetración en el tejido por el ajuste en la frecuencia, los ciclos de trabajo y el tiempo de exposición. Los ultrasonidos se pueden usar como desencadenantes de la liberación de fármacos por sus efectos térmicos, mecánicos (cavitación) y fuerzas de radiación⁷.

Los efectos térmicos se deben a que las ondas de ultrasonidos se propagan por el cuerpo y se atenúan por el contacto con diferentes tejidos a través de los efectos de absorción, que producen un aumento de la temperatura de los tejidos, y dispersión. Para conseguir una hipertermia controlada, la frecuencia debe estar en el rango de MHz porque en estos límites los efectos térmicos de los ultrasonidos son significativos y no lo son los efectos mecánicos³³. Como ya se ha comentado, la hipertermia se puede utilizar para desencadenar la liberación de fármacos de nanopartículas termosensibles. Celsion Corporation está estudiando la combinación de los liposomas ThermoDox® con la aplicación de ultrasonidos para tratar el cáncer de hígado metastásico, metástasis óseas dolorosas y cáncer pancreático⁷.

Por otro lado, la cavitación es un efecto mecánico. Para que tenga lugar se necesitan los llamados “núcleos de cavitación” que son burbujas de gas encerradas en un sistema (lípidos, capa polimérica). Las moléculas de fármaco pueden encapsularse en las burbujas, ser inyectadas a la vez que las burbujas, o ser encapsuladas o unidas covalentemente al lípido o al polímero³⁵. Hay NPs como liposomas y micelas que encapsulan gases, como el perfluorocarbono, e incorporan fármacos, siendo los antitumorales los más comunes^{7,35}.

La cavitación se produce porque las ondas de ultrasonidos son una sucesión de picos de presión negativos, que constituyen la fase de depresión donde las burbujas crecen, y positivos, que dan lugar a la fase de compresión donde las burbujas se contraen (*Figura 8*). La cavitación se produce a frecuencias menores de las que dan lugar a los efectos térmicos y la probabilidad de que ocurra es mayor cuando el pico de presión negativa aumenta y la frecuencia disminuye³⁵. Hay dos tipos de cavitación que se pueden producir:

- Cavitación estable o no inercial: en los picos negativos las burbujas crecen hasta alcanzar un tamaño máximo. Le sigue una oscilación lineal alrededor del diámetro de equilibrio.
- Cavitación inercial: ocurre a picos de presión negativos mayores donde las burbujas no responden linealmente al estímulo, se desencadena una oscilación asimétrica y, finalmente, la explosión³⁵.

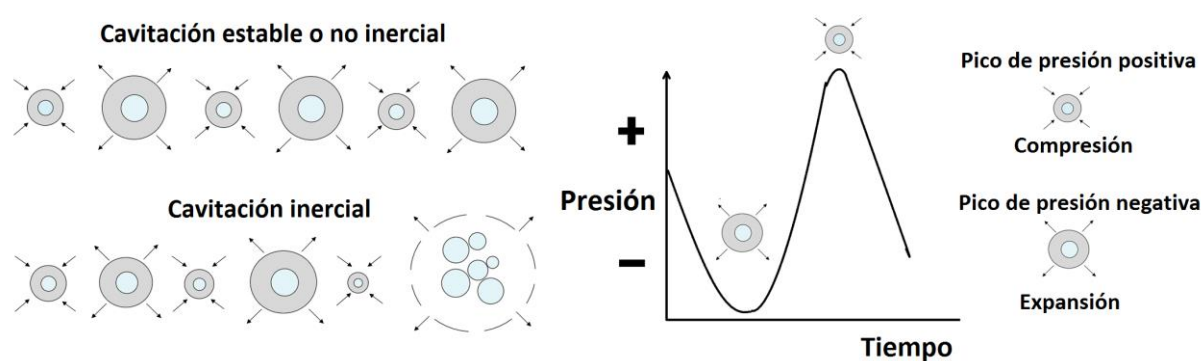


Figura 8.- Representación esquemática de lo que ocurre durante la cavitación estable e inercial.

Las fuerzas de radiación abarcan una serie de mecanismos que no están totalmente descritos que no son térmicas ni cavitacionales. A altas presiones, del orden de MPa, y a frecuencias del orden de MHz, las ondas de ultrasonidos generan una fuerza unidireccional que da lugar a una fuerza translacional que empuja a las partículas a las paredes de los vasos sanguíneos. Esto se relaciona con una mayor retención del material en el tejido, por ejemplo, tumoral³⁴.

También se pueden utilizar los ultrasonidos para romper algunos enlaces y conseguir cambios de conformación de polímeros y la liberación del fármaco. Este es el principio utilizado en unas NPs de sílice mesoporosa cargadas de doxorubicina. En sus poros hay una compuerta polimérica donde uno de sus componentes es el monómero hidrofóbico 2-tetrahidropiranyl metacrilato (THPMA). El THPMA contiene un grupo acetal que se hidroliza al aplicar ultrasonidos a ácido metacrílico (MAA), un compuesto hidrófilo. Esto produce un cambio de conformación en el polímero, la apertura de la compuerta de los poros y la liberación de la doxorubicina³⁶.

2.4.-Luz

Debido a su naturaleza no invasiva y a la posibilidad del control temporal de la liberación del fármaco, se han diseñado una gran variedad de nanosistemas respondedores a la luz de una longitud de onda específica: ultravioleta, visible o del infrarrojo cercano (NIR)⁷.

La forma de conseguir un nanotransportador sensible a la luz es incorporando grupos químicos fotosensibles con enlaces covalentes. Al aplicar la luz se producen cambios conformacionales que desencadenan la liberación del fármaco. Algunos nanotransportadores son de un solo uso porque la luz produce un cambio estructural irreversible con el objetivo de liberar toda la carga de fármaco; otros consiguen una liberación pulsátil porque se aplican ciclos de luz/oscuridad que producen cambios estructurales reversibles¹.

El mayor inconveniente que presenta este estímulo en los sistemas de liberación de fármacos es su baja profundidad de penetración (de aproximadamente 10 mm). Esto se debe a la dispersión de la luz de la región ultravioleta-visible (300-700 nm) en los tejidos blandos. Por eso, son más prometedores los grupos fotosensibles que respondan a longitudes de onda mayores que corresponden al NIR (700-1000 nm). Con esto se consigue una mayor profundidad de penetración en los tejidos, menor dispersión y daños tisulares mínimos⁷.

El azobenceno y sus derivados sufren una fotoisomerización reversible de trans a cis cuando la radiación es ultravioleta (300-380 nm) y de cis a trans cuando es del espectro visible (400-700 nm). El cambio trans-cis está asociado a una transición hidrófobo-hidrófilo, por eso se ha utilizado como compuerta de nanopartículas de sílice mesoporosa y en micelas⁷.

También se ha probado el grupo orto-nitrobenzoil y sus derivados como enlace fotosensible en nanopartículas de oro para la unión directa de fármacos, en compuertas de nanopartículas de sílice mesoporosa y como enlace de red de polímeros en nanoesferas y dendrímeros⁷.

Por ejemplo, se ha diseñado un dendrímero que se une a la doxorrubicina mediante enlaces orto-nitrobenzoil. Cuando se aplica radiación ultravioleta del rango de 254 a 365 nm, se escinden estos enlaces y se libera el fármaco²² (Figura 10).

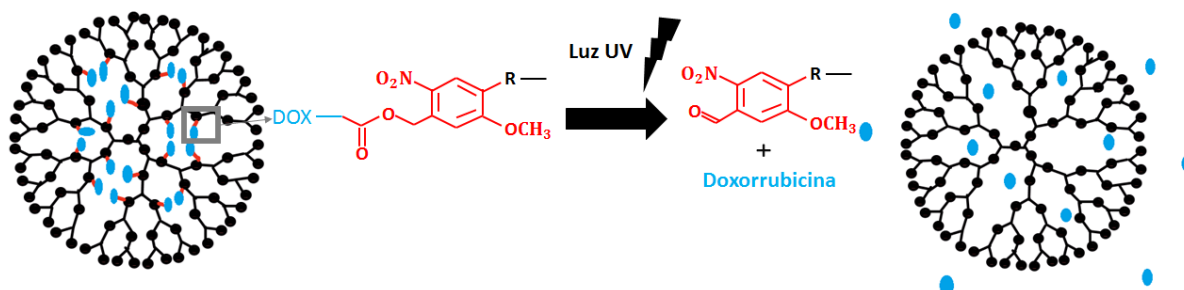


Figura 10.- Dendrímero que libera doxorrubicina para el tratamiento del cáncer.

También se han desarrollado nanoesferas en formulación depot constituidas por un polímero fotosensible con grupos orto-nitrobenzoil para conseguir la liberación a demanda de nintedanib, fármaco inhibidor de la angiogénesis que se usa en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). Es un sistema on-off con el que se consigue la liberación pulsátil del fármaco al aplicar luz UV de 365 nm. Mientras que los sistemas convencionales se administran por inyección intravítrea cada 4-8 semanas, estas NPs siguen presentes en el espacio intravítreo con capacidad de liberar el fármaco encapsulado hasta 30 semanas después de la inyección. Gracias al sistema on-off se consigue mejorar la dosificación del fármaco y aumenta la eficacia del tratamiento de la DMAE³⁷.

Los materiales plasmónicos (metales nobles, especialmente el oro y la plata) son capaces de absorber radiación NIR para convertir la energía fotónica absorbida en calor⁷. Con esta aplicación destacan las nanopartículas de oro (AuNPs) por su alto valor de resonancia de superficie plasmónica (RSP). Cuando las AuNPs se exponen a la luz, la oscilación del campo electromagnético de la luz induce una oscilación colectiva de los electrones libres (los electrones de banda) del oro. La oscilación de los electrones alrededor de la superficie de la partícula produce una separación de cargas con respecto a la red iónica, formando una oscilación dipolar a lo largo de la dirección del campo eléctrico de la luz. La amplitud de la oscilación alcanza un máximo a una frecuencia específica llamada RSP. Esta RSP puede coincidir con la frecuencia de la radiación NIR por lo que las AuNPs absorben la luz incidente NIR y la transforman en calor³⁸.

Un ejemplo de nanotransportadores fototérmicos son las nanopartículas de oro unidas covalentemente a ácido arginina-glicina-aspartico (ligando selectivo para tumores) y a doxorrubicina (fármaco antineoplásico). Al aplicar radiación IR se produce calor que contribuye a la muerte de las células cancerosas junto con la doxorrubicina por lo que la eficacia antitumoral aumenta³⁹.

2.5.- Potencial clínico de las NPs sensibles a estímulos externos

Los resultados obtenidos *in vitro* de estos nanotransportadores son muy prometedores. Su evaluación en modelos animales es más sencilla que en el caso de los que usan estímulos internos, ya que la aplicación del estímulo es más fácil y no depende del desarrollo fisiopatológico de la enfermedad.

En este caso sí hay sistemas que han conseguido alcanzar los ensayos clínicos (ThermoDox® y NanoTherm®). La mejora futura de las NPs pasa por perfeccionar su diseño para que sean más biocompatibles y selectivos para que liberen el fármaco solo al aplicar el estímulo^{1,4,5,7}.

Conclusiones

La versatilidad de las NPs para incorporar moléculas que les permitan responder a un estímulo concreto y su capacidad para incorporar fármacos convierten a la nanotecnología en un campo prometedor para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos.

El poder controlar la liberación de los fármacos temporal y espacialmente es una ventaja frente a los sistemas convencionales. Son especialmente atractivos para patologías de difícil tratamiento como puede ser el cáncer, ya que con estos nanosistemas inteligentes se consigue aumentar la eficacia y reducir los efectos secundarios de la medicación.

El futuro de estos nanotransportadores pasa por una mayor investigación en la ciencia de materiales, para conseguir diseños más eficaces, y en las bases fisiopatológicas de las enfermedades, para abordar más eficazmente la zona afectada. El farmacéutico, como especialista en el medicamento, puede contribuir en el perfeccionamiento del diseño de las nanopartículas estímulo-respuesta y en la investigación de la base biológica de las enfermedades. Por ello, es importante su presencia como profesionales de la salud en todas las fases del desarrollo de nuevos tratamientos.

Bibliografía

1. Crucho C. Stimuli-Responsive Polymeric Nanoparticles for Nanomedicine. ChemMedChem. 2014;10(1):24-38.
2. Kreuter J, Speiser P. In Vitro Studies of Poly(methyl Methacrylate) Adjuvants. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1976;65(11):1624-1627.
3. de Jong W, Borm P. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. International Journal of Nanomedicine. 2008;3(2):133-149.
4. Lee B, Yun Y, Park K. Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. Chemical Engineering Science. 2015;125:158-164.
5. Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, Amiji M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. Journal of Controlled Release. 2008;126(3):187-204.
6. Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. Theranostics. 2016;6(9):1306-1323.
7. Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. Nature Materials. 2013;12(11):991-1003.
8. Yatvin M, Weinstein J, Dennis W, Blumenthal R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. Science. 1978;202(4374):1290-1293.
9. Karimi M, Ghasemi A, Sahandi Zangabad P, Rahighi R, Moosavi Basri S, Mirshekari H et al. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. Chem Soc Rev. 2016;45(5):1457-1501.

10. Roco M. The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *Journal of Nanoparticle Research*. 2011;13(2):427-445.
11. Chen H, Liu D, Guo Z. Endogenous Stimuli-responsive Nanocarriers for Drug Delivery. *Chemistry Letters*. 2016;45(3):242-249.
12. Bamrungsap S, Zhao Z, Chen T, Wang L, Li C, Fu T et al. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*. 2012; 7(8):1253-1271.
13. Safari J, Zarnegar Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2014;18(2):85-99.
14. Ma N, Ma C, Li C, Wang T, Tang Y, Wang H et al. Influence of Nanoparticle Shape, Size, and Surface Functionalization on Cellular Uptake. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2013;13(10):6485-6498.
15. Morachis J, Mahmoud E, Almutairi A. Physical and Chemical Strategies for Therapeutic Delivery by Using Polymeric Nanoparticles. *Pharmacological Reviews*. 2012;64(3):505-519.
16. Karimi M, Eslami M, Sahandi-Zangabad P, Mirab F, Farajisafiloo N, Shafaei Z et al. pH-Sensitive stimulus-responsive nanocarriers for targeted delivery of therapeutic agents. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2016;8(5):696-716.
17. Lin Z, Li J, He H, Kuang H, Chen X, Xie Z et al. Acetalated-dextran as valves of mesoporous silica particles for pH responsive intracellular drug delivery. *RSC Adv*. 2015;5(13):9546-9555.
18. Radovic-Moreno A, Lu T, Puscasu V, Yoon C, Langer R, Farokhzad O. Surface Charge-Switching Polymeric Nanoparticles for Bacterial Cell Wall-Targeted Delivery of Antibiotics. *ACS Nano*. 2012;6(5):4279-4287.
19. Ko J, Park K, Kim Y, Kim M, Han J, Kim K et al. Tumoral acidic extracellular pH targeting of pH-responsive MPEG-poly(β -amino ester) block copolymer micelles for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. 2007;123(2):109-115.
20. Hu Q, Katti P, Gu Z. Enzyme-responsive nanomaterials for controlled drug delivery. *Nanoscale*. 2014;6(21):12273-12286.
21. Nguyen M, Carlini A, Chien M, Sonnenberg S, Luo C, Braden R et al. Stimuli-Responsive Materials: Enzyme-Responsive Nanoparticles for Targeted Accumulation and Prolonged Retention in Heart Tissue after Myocardial Infarction (*Adv. Mater.* 37/2015). *Advanced Materials*. 2015;27(37):5446-5446.
22. Wang H, Huang Q, Chang H, Xiao J, Cheng Y. Stimuli-responsive dendrimers in drug delivery. *Biomater Sci*. 2016;4(3):375-390.
23. Gu Z, Aimetti A, Wang Q, Dang T, Zhang Y, Veisheh O et al. Injectable Nano-Network for Glucose-Mediated Insulin Delivery. *ACS Nano*. 2013;7(5):4194-4201.
24. Veisheh O, Tang B, Whitehead K, Anderson D, Langer R. Managing diabetes with nanomedicine: challenges and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014;14(1):45-57.

25. Phillips D, Gibson M. Redox-Sensitive Materials for Drug Delivery: Targeting the Correct Intracellular Environment, Tuning Release Rates, and Appropriate Predictive Systems. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;21(5):786-803.
26. Zhao M, Biswas A, Hu B, Joo K, Wang P, Gu Z et al. Redox-responsive nanocapsules for intracellular protein delivery. *Biomaterials*. 2011;32(22):5223-5230.
27. de Gracia Lux C, Joshi-Barr S, Nguyen T, Mahmoud E, Schopf E, Fomina N et al. Biocompatible Polymeric Nanoparticles Degrade and Release Cargo in Response to Biologically Relevant Levels of Hydrogen Peroxide. *Journal of the American Chemical Society*. 2012;134(38):15758-15764.
28. Yarmolenko P, Zhao Y, Landon C, Spasojevic I, Yuan F, Needham D et al. Comparative effects of thermosensitive doxorubicin-containing liposomes and hyperthermia in human and murine tumours. *International Journal of Hyperthermia*. 2010;26(5):485-498.
29. Karimi M, Sahandi Zangabad P, Ghasemi A, Amiri M, Bahrami M, Malekzad H et al. Temperature-Responsive Smart Nanocarriers for Delivery Of Therapeutic Agents: Applications and Recent Advances. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2016;8(33):21107-21133.
30. Hua M, Liu H, Yang H, Chen P, Tsai R, Huang C et al. The effectiveness of a magnetic nanoparticle-based delivery system for BCNU in the treatment of gliomas. *Biomaterials*. 2011;32(2):516-527.
31. Kumar C, Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011;63(9):789-808.
32. Zhang W, Zuo XD, Wu W. Synthesis and magnetic properties of carbon nanotube-iron oxide nanoparticle composites for hyperthermia: a review. *Rev. Adv. Mater. Sci*. 2015;40:165-176.
33. Rivera Gil P, Hühn D, del Mercato L, Sasse D, Parak W. Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds. *Pharmacological Research*. 2010;62(2):115-125.
34. Hayashi K, Nakamura M, Miki H, Ozaki S, Abe M, Matsumoto T et al. Magnetically Responsive Smart Nanoparticles for Cancer Treatment with a Combination of Magnetic Hyperthermia and Remote-Control Drug Release. *Theranostics*. 2014;4(8):834-844.
35. Boissenot T, Bordat A, Fattal E, Tsapis N. Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: From theoretical considerations to practical applications. *Journal of Controlled Release*. 2016;241:144-163.
36. Paris JL, Cabañas MV, Manzano M, Vallet-Regí M. Polymer-Grafted Mesoporous Silica Nanoparticles as Ultrasound-Responsive Drug Carriers. *ACS Nano*. 2015;9(11):11023-11033.
37. Huu V, Luo J, Zhu J, Zhu J, Patel S, Boone A et al. Light-responsive nanoparticle depot to control release of a small molecule angiogenesis inhibitor in the posterior segment of the eye. *Journal of Controlled Release*. 2015;200:71-77.
38. Huang X, El-Sayed M. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*. 2010;1(1):13-28.
39. Tian L, Lu L, Qiao Y, Ravi S, Salatan F, Melancon M. Stimuli-Responsive Gold Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Journal of Functional Biomaterials*. 2016;7(3):19.